

Rec'd PCT/PTO 01 MAR 2006

PCT/JP2004/012361

10/570046
30.08.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

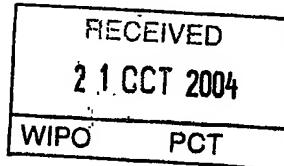
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 9月 3日

出願番号
Application Number: 特願 2003-311936

[ST. 10/C]: [JP 2003-311936]



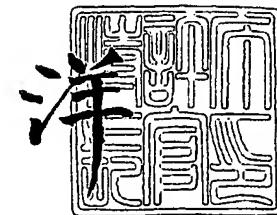
出願人
Applicant(s): 中村 敏一
クリングルファーマ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特 2004-3090333

【書類名】 特許願
【整理番号】 K12J1127
【提出日】 平成15年 9月 3日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 38/22
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東3-8-19-203
 【氏名】 吉田 佐保
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東6-25-2-204
 【氏名】 松本 邦夫
【発明者】
 【住所又は居所】 兵庫県川西市けやき坂3-37-7
 【氏名】 板見 智
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府豊能郡豊能町ときわ台9-3-14
 【氏名】 吉川 邦彦
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府高槻市高見台4-1
 【氏名】 中村 敏一
【特許出願人】
 【識別番号】 591115073
 【氏名又は名称】 中村 敏一
【特許出願人】
 【識別番号】 502068908
 【氏名又は名称】 クリングルファーマ株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100077012
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 岩谷 龍
 【電話番号】 06-4796-1300
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 066372
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0204590

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする皮膚潰瘍予防治療剤。

【請求項2】

第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする血管新生促進剤。

【請求項3】

第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする肉芽増生促進剤。

【請求項4】

第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする皮膚潰瘍予防治療剤。

【請求項5】

第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする血管新生促進剤。

【請求項6】

第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする肉芽増生促進剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】ヒト組換えHGFを含有する皮膚潰瘍予防治療剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト組換えHGFまたはヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有する皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤および肉芽増生促進剤に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞増殖因子は皮膚において細胞の増殖、遊走、アポトーシス（細胞死）または細胞外マトリックス産生などを制御することによって皮膚の創傷治癒に関与している。増殖因子の投与によって正常動物における皮膚の創傷治癒の促進されること、あるいは皮膚の創傷治癒能が低下している糖尿病、ステロイド投与および栄養失調のモデル動物において増殖因子が皮膚の創傷治癒能の低下を代償することが報告されている（非特許文献1、非特許文献2）。糖尿病マウスにおいては正常のマウスに比べ皮膚創傷治癒は遅延するが、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor；bFGF）、血小板由来増殖因子（platelet-derived growth factor）、インスリン様増殖因子-I（insulin-like growth factor-I）、ならびにトランスフォーミング増殖因子- α （transforming growth factor- α ）の局所投与が皮膚創傷治癒を促進することが報告されている（非特許文献4～6）。さらに、組換えbFGFは皮膚潰瘍の治療薬として利用されている。

【0003】

当初、成熟肝細胞に対する増殖促進因子として発見されたHGF（hepatocyte growth factor；肝細胞増殖因子）は各種傷害に対して組織の再生ならびに保護を担う生理機能を有している（非特許文献7～10）。皮膚においてもHGFが表皮ケラチノサイト（角化細胞）またはメラノサイトの増殖や遊走を促進することが明らかにされ、HGFが皮膚の生理機能や創傷治癒に関与することが示唆された（非特許文献11～13）。本発明者らは、さらに皮膚の生理機能や創傷治癒に対するHGFの役割について検討を重ね、組換えHGFを有効成分とする創傷治療又は皮膚潰瘍治療剤を開発し、特許を得ている（特許文献1）。その後の研究でも、実験動物においてHGFが皮膚創傷治癒に関与することが支持されている。例えば、HGFならびにc-Met/HGFレセプターの発現は皮膚創傷に応じて増加する（非特許文献14、非特許文献15）。HGFを過剰発現するトランジエニックマウスにおいて皮膚創傷後の血管新生や肉芽組織の増大が見られる（非特許文献16）。一方、皮膚創傷治癒モデルにおいて中和抗体の投与によって内因性HGFの作用をブロックすると表皮の再生や血管新生が抑制され治癒が遅延する（非特許文献15）。

【0004】

【特許文献1】特許第3200609号公報

【非特許文献1】Suh, D.Y., Hunt, T.K. and Spencer, E.M., "Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats.", Endocrinology, 131, p.2399-2403(1992).

【非特許文献2】Albertson, S., Hummel, R.P., 3rd, Breeden, M. and Greenhalgh, D.G., "PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein-malnourished diabetic mice.", Surgery, 114, p.368-372; discussion p.372-363 (1993).

【非特許文献3】Greenhalgh, D.G., Sprugel, K.H., Murray, M.J. and Ross, R., "PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse.", The American Journal of Pathology, 136, p.1235-1246(1990).

【非特許文献4】Tsuboi, R. and Rifkin, D.B., "Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice.", Journal of Experimental Medicine, 172, p.245-251 (1990).

【非特許文献5】Brown, R.L., Breeden, M.P. and Greenhalgh, D.G., "PDGF and TGF-alpha act synergistically to improve wound healing in the genetically di

abetic mouse." , Journal of Surgical Research, 56, p.562-570 (1994).

【0005】

【非特許文献6】 Tsuboi, R., Shi, C.M., Sato, C., Cox, G.N. and Ogawa, H., "Co-administration of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 stimulates wound healing in animal models." , Journal of Investigative Dermatology, 104, p.199-203 (1995).

【非特許文献7】 Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K. and Shimizu, S., "Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor." , Nature, 342, p.440-443 (1989).

【非特許文献8】 Boros, P. and Miller, C.M., "Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine." , Lancet, 345, p.293-295 (1995).

【非特許文献9】 Zarnegar, R. and Michalopoulos, G.K. , "The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis." , Journal of Cell Biology, 129, p.1177-1180 (1995).

【非特許文献10】 Matsumoto, K. and Nakamura, T., "Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases." , Kidney International, 59, p.2023-2038 (2001).

【0006】

【非特許文献11】 Matsumoto, K., Hashimoto, K., Yoshikawa, K. and Nakamura, T., "Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor." , Experimental Cell Research, 196, p.114-120 (1991)

【非特許文献12】 Matsumoto, K., Tajima, H. and Nakamura, T., "Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth." , Biochemical and Biophysical Research Communications, 176, p.45-51 (1991).

【非特許文献13】 Halaban, R., Rubin, J.S., Funasaka, Y., Cobb, M., Boulton, T., Faletto, D., Rosen, E., Chan, A., Yoko, K., White, W. and et al., "Met and hepatocyte growth factor/scatter factor signal transduction in normal melanocytes and melanoma cells." , Oncogene, 7, p.2195-2206 (1992).

【非特許文献14】 Cowin, A.J., Kallincos, N., Hatzirodos, N., Robertson, J.G., Pickering, K.J., Couper, J. and Belford, D.A., "Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats." , Cell and Tissue Research, 306, p.239-250 (2001).

【非特許文献15】 Yoshida, S., Yamaguchi, Y., Itami, S., Yoshikawa, K., Tabata, Y., Matsumoto, K. and Nakamura, T., "Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation." , Journal of Investigative Dermatology, 120, p.335-343 (2003).

【非特許文献16】 Toyoda, M., Takayama, H., Horiguchi, N., Otsuka, T., Fukusato, T., Merlini, G., Takagi, H. and Mori, M., "Overexpression of hepatocyte growth factor/scatter factor promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo." , FEBS Letters, 509, p.95-100 (2001).

【非特許文献17】 Seki, T., Ihara, I., Sugimura, A., Shimonishi, M., Nishizawa, T., Asami, O., Hagiya, M., Nakamura, T. and Shimizu, S., "Isolation and expression of cDNA for different forms of hepatocyte growth factor from human leukocyte." , Biochemical Biophysical Research Communications, 172, 321-327 (1990)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、優れた肉芽増生および血管新生促進作用を有し組織修復に有効な医薬品、なかでも皮膚潰瘍予防治療剤として有用な医薬品を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、前記特許文献1に記載の発明についてさらに鋭意研究を重ねた結果、HGFのなかでも第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFが外因的補充によって肉芽増生および血管新生を促進させる作用に優れていることを知見した。前記ヒト組換えHGFのかかる作用を利用すれば、広く組織修復に優れた医薬品を提供することができる。なかでも、前記ヒト組換えHGFは、糖尿病、静脈うつ滞、膠原病または熱傷などに起因する皮膚潰瘍の予防または治療に特に優れた効果を奏することを知見した。

前記ヒト組換えHGFは公知のタンパク質であるが（非特許文献17）、非特許文献17には肉芽増生および血管新生の促進作用について記載されていないし、示唆さえされていない。一方、非特許文献15および非特許文献16には内因性HGFが肉芽増生および血管新生に関与することは記載されているが、HGFを投与した場合かかる外因性HGFが同一の現象を引き起こすか否かについては全く検討されていないうえに、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFについて記載も示唆もされていない。

さらに、本発明者らは検討を重ねて、本発明を完成した。

【0009】

すなわち、本発明は、

- (1) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする皮膚潰瘍予防治療剤、
- (2) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする血管新生促進剤、
- (3) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有することを特徴とする肉芽増生促進剤、
- (4) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする皮膚潰瘍予防治療剤、
- (5) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする血管新生促進剤、
- (6) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有することを特徴とする肉芽増生促進剤、

に関する。

【0010】

また、本発明は、

- (7) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを用いることを特徴とする皮膚潰瘍の予防または治癒方法、
- (8) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを用いることを特徴とする血管新生促進方法、
- (9) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを用いることを特徴とする肉芽増生促進方法、
- (10) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を用いることを特徴とする皮膚潰瘍の予防または治癒方法、
- (11) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を用いることを特徴とする血管新生促進方法、
- (12) 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFをコードする遺伝子を用いることを特徴とする肉芽増生促進方法、

に関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明は、第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGF（以下、単に「ヒト組換えHGF」という）または前記ヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有する肉芽増生促進剤および血管新生促進剤を提供する。かかる医薬品は、皮膚潰瘍の予防または治療をはじめとして広く組織修復に利用することができる。さらに、前記ヒト組換えHGFは生体由来のものまたは生体由来のHGFを起源とするものであることから、生体に投与しても安全であり副作用が少ない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明で用いるヒト組換えHGFは、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するHGFにおいて、N末端から128～206番目に位置する第一クリングルドメインのうち5個のアミノ酸残基が欠損している。欠損している5個のアミノ酸残基は連続して存在してもよいし、2～5カ所に分かれて存在してもよいが、連続して存在している方が好ましい。本発明で用いるヒト組換えHGFとしては、配列番号1で示されるアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されているアミノ酸配列からなることが好ましい。なかでも、配列番号1で示されるアミノ酸配列、または当該アミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が置換されているアミノ酸配列からなることがより好ましく、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなることが特に好ましい。なお、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1乃至数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されているアミノ酸配列からなるタンパク質は、HGFと実質的に同質の機能、例えば成熟肝細胞に対する増殖促進活性を有することが好ましい。

【0013】

本発明で用いるヒト組換えHGFとしては、遺伝子組み換え技術等を用いて生産されたものに限定されず、HGFの多様なファミリーの一種として生体内に存在するものであってもよい。

遺伝子組み換え技術等を用いて本発明のヒト組換えHGFを生産する方法としては公知の方法を用いてよく、例えば「Biochemical Biophysical Research Communications, 172, 321-327 (1990)」（非特許文献17）に記載されている方法が好適である。

生体内から本発明のヒト組換えHGFを単離・精製する方法としては、例えば比較的高濃度にHGFを含む成熟肝細胞や血小板をトロンビン処理し、血小板外へ分泌されるHGFを取得後、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンセファロースによるアフィニティクロマトグラフィーまたは逆相高速液体クロマトグラフィー等を用いて精製する方法等が挙げられる。通常はヒトの組織または細胞を用いて本発明のヒト組換えHGFを単離・精製するが、単離されるHGFが本発明の上記条件を満たす限り、ヒト以外の哺乳動物、例えばラット、モルモット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等の組織または細胞をHGFの単離・精製のために用いてもよい。

【0014】

本発明で用いられるヒト組換えHGFは、当該技術分野で公知の種々の修飾を受けていてもよい。

例えば、本発明で用いられるヒト組換えHGFのC末端のカルボキシル基は、アミド化、エステル化またはイオン化されていてもよい。具体的には、C末端のカルボキシル基（-COOH）がカルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）に置換されていてもよい。ここでエステルにおける置換基Rとしては、例えばメチル、エチル、n-ブロピル、イソブロピルもしくはn-ブチルなどのC₁～6アルキル基；例えばシクロヘキシル、シクロヘキシルなどのC₃～8シクロアルキル基；例えばフェニル、α-ナフチルなどのC₆～12アリール基；例えば、ベンジル、フェニルなどのフェニル-C₁～2アルキル基もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁～2アルキル基などのC₇～14アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基など

が挙げられる。さらに、本発明で用いられるヒト組換えHGFがC末端以外にカルボキシル基を有している場合、上記と同様にカルボキシル基がアミド化、エステル化またはイオン化されていてもよい。

【0015】

本発明に用いられるヒト組換えHGFとしては、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂～6アルカノイル基などのC₁～6アシル基など）で保護されているもの、N末端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、アミノ酸側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂～6アルカノイル基などのC₁～6アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。なかでも、本発明に用いられるヒト組換えHGFとしては糖鎖が結合しているものが望ましく、結合する糖としてはフコース、ガラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミンなどが挙げられる。

【0016】

本発明に用いられるヒト組換えHGFは薬理学的に許容される塩を形成していくてもよい。本発明のヒト組換えHGFが塩基性を示す場合、前記薬理学的に許容される塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、または有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔴酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが挙げられる。本発明のヒト組換えHGFが酸性を示す場合、前記薬理学的に許容される塩としては、無機塩基（例えばナトリウム塩もしくはカリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩もしくはマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩またはアンモニウム塩など）との塩、または有機塩基（例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミンもしくはN,N'-ジベンジルエチレンジアミンなど）との塩などが挙げられる。

【0017】

本発明で用いられるヒト組換えHGFをコードする遺伝子としては、上述してきたヒト組換えHGFをコードする遺伝子であれば特に限定されないが、(a)配列番号2で表わされる塩基配列からなるDNA、または(b)配列番号2で表わされる塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、HGFと実質的に同質の活性、例えば成熟肝細胞に対する増殖促進活性等を有するタンパク質をコードするDNA等が好適な例として挙げられる。本発明では、配列番号2で表わされる塩基配列を含むまたはからなるDNAを用いることが特に好ましい。

【0018】

配列番号2で表わされる塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAとは、例えば上記DNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味する。具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、約0.7～1.0M程度の塩化ナトリウム存在下、約65℃程度でハイブリダイゼーションを行った後、約0.1～2倍程度の濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用いて約65℃程度の条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

上記の配列番号2で表わされる塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAとして具体的には、配列番号2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNA等が挙げられる。ハイブリダイゼーションは、公知の方法、例えばモレキュラー・クローニング（Molecular Cloning, A laboratory Manual, Third Edition (J

Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001: 以下、モレキュラー・クローニング第3版と略す)に記載の方法等に従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

【0019】

本発明で用いられるヒト組換えHGFをコードする遺伝子は、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接RT-PCR法によって増幅することによりヒト組換えHGFをコードするDNAを得ることもできる。また、RNAも、逆転写酵素により本発明のヒト組換えHGFを発現することができるものであれば用いることができる。該RNAも公知の手段により得ることができる。

【0020】

本発明で用いられるヒト組換えHGFをコードする遺伝子は公知の方法により得ることができ、例えば前記「Biochemical Biophysical Research Communications, 172, 321-327 (1990)」(非特許文献17)に記載されている方法を用いることが好ましい。さらに、得られた遺伝子に対して公知の処理を施してもよい。例えば、DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-superExpress Km (宝酒造)、MutanTM-K (宝酒造)等を用いて、ODA-LA PCR法、gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。また、制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりすることもできる。さらに、翻訳開始コドン(ATG)や翻訳終止コドン(TAA、TGAまたはTAG)を適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0021】

本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子は、細胞内でのその安定性を高めるため、また、もし毒性があるならその毒性をより小さなものにするために修飾されていてよい。このような修飾には、例えばJ. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol.8, p247 (1992) ; Vol.8, p395 (1992) ; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press (1993)等に記載された方法による修飾が挙げられる。さらに、アデニン、チミジン、グアニンおよびシトシン以外の他の物質の付加による修飾も挙げられる。前記他の物質としては、糖；酸または塩基；リン酸基骨格の電荷を中和するよう働くポリリジンのようなポリカチオン体；脂質などの疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、細胞膜との相互作用の向上または核酸の取込みの増大に寄与するものが好ましく、具体的にはコレステロールやその誘導体(例えばコレステリルクロロホルムートまたはコール酸等)またはホスホリピドなどが挙げられる。前記他の物質は、核酸の3'末端あるいは5'末端に付着させることもできるし、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることもできる。また、本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子の修飾として、遺伝子の末端の化学修飾も挙げられる。末端の修飾基としては、核酸の3'末端あるいは5'末端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼまたはRNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。前記キャップ用の基としては、ポリエチレングリコールまたはテトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

【0022】

本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子は製剤化する際にそのまま用いてもよいが、発現ベクターに挿入した形態で用いてもよい。前記発現ベクターは本発明のヒト組換えHGFを発現することができればよく、例えば本発明のヒト組換えHGFをコードするDNA断片が適当なプロモーターの下流に連結されているベクターなどが挙げられる。

【0023】

前記発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス（HIV）、センダイウイルス、エブスタイン-バーワイルス（EBV）、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40等のウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRC/CMV、pRC/RSV、pCDNA1/neoなどが用いられる。中でも、ウイルスが好ましく、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アデノウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス（HIV）、センダイウイルス、エブスタイン-バーワイルス（EBV）、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、SV40等を用いることが好ましい。さらにアデノ随伴ウイルス（AAV）またはアデノウイルス等を用いることがより好ましい。アデノウイルスには種々の血清型が存在するが、本発明では2型または5型ヒトアデノウイルスを使用することが好ましい。

また、発現ベクターを後述するように宿主細胞に導入せず裸のベクターとして生体内にin vivo導入する場合、使用される発現ベクターとしてはpCAGGS[Gene, 108, p193-200 (1991)]、pBK-CMV、pCDNA3.1、pZeoSV（インビトロゲン社、ストラジーン社）等のプラスミドが好ましい。

【0024】

前記プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に応じた適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合はtrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーターまたはlppプロモーターなどが好ましく、宿主がバチルス属菌である場合はSPO1プロモーター、SPO2プロモーターまたはpenPプロモーターなどが好ましく、宿主が酵母である場合はPHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーターまたはADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0025】

前記発現ベクターは、本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子およびプロモーターの他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカーまたはSV40複製オリジンなどを有していてもよい。選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素（以下dhfrと略称する場合がある）遺伝子（メソトレキセート（MTX）耐性）、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子（G418耐性）等が挙げられる。特にdhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHOを用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、シグナル配列としては、宿主がエシェリヒア属菌である場合はPhoA・シグナル配列もしくはOmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合はα-アミラーゼ・シグナル配列もしくはサブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合はMFα・シグナル配列もしくはSUC2・シグナル配列などが、宿主が動物細胞である場合にはインシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列もしくは抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0026】

このようにして構築された本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を含有する発現ベクターは、さらに宿主に導入し形質転換体の形態で製剤化の際に用いることができる。形質転換体を投与することにより、投与された生体内において本発明のヒト組換えHGF

Fが形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に生成され、本発明のヒト組換えHGFを生体に有効に投与することができる。

上記発現ベクターを導入する宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、ビフィズス菌、乳酸菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、Escherichia coli K12・DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60巻, 160 (1968))、JM103 (Nucleic Acids Research, 9巻, 309 (1981))、JA221 (Journal of Molecular Biology, 120巻, 517 (1978))、HB101 [Journal of Molecular Biology, 41巻, 459 (1969)]、C600 (Genetics, 39巻, 440 (1954))、DH5 α (Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990))、DH10B (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87巻, 4645-4649 (1990))等が挙げられる。バチルス属菌としては、例えばBacillus subtilis M114 (Gene, 24巻, 255 (1983))、Journal of Biochemistry, 95巻, 87 (1984))等が挙げられる。ビフィズス菌としては、例えばBifidobacterium longum、Bifidobacterium bifidum、Bifidobacterium breve等が挙げられる。乳酸菌としては、例えばラクトバチラス属 (Lactobacillus)、ストレプトコッカス属 (Streptococcus)、ロイコノストック属 (Leuconostoc)、ペディオコッカス属 (Pediococcus)等が挙げられる。酵母としては、例えばSaccharomyces cerevisiae AH22、AH22R $^{-}$ 、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、Schizosaccharomyces pombe NCYC1913、NCYC2036、Pichia pastoris等が挙げられる。

【0027】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM 細胞、Mamestrabrassicae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが挙げられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞)などが挙げられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. et. al., In Vivo, 13, p213-217 (1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫等が挙げられる (前田ら、Nature, 315, 592 (1985))。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr $^{-}$) 細胞と略記)、マウスL細胞、マウスA_{tt}T-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが挙げられる。

【0028】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, p2110 (1972)」や「Gene, 17, p107 (1982)」等に記載の方法に従って行うことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば「Molecular & General Genetics, 168, p11 (1979)」等に記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば「Methods in Enzymology, 194巻, p182-187 (1991)」、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, p1929 (1978)」等に記載の方法に従って行うことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば「Bio/Technology, 6, p47-55 (1988)」等に記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば「細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール, p263-267 (1995) (秀潤社発行)」、「Virology, 52巻, p456 (1973)」等に記載の方法に従って行うことができる。

【0029】

このようにして得られた形質転換体を培養することにより、本発明にかかる薬剤の原料を多量に得ることができる。宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉またはショ糖などが挙げられ、窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、

カゼイン、肉エキス、大豆粕またはバレイショ抽出液などの無機または有機物質が挙げられ、無機物としては、例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウムまたは塩化マグネシウムなどが挙げられる。さらに、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

【0030】

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコースおよびカザミノ酸を含むM9培地 (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, p431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることができる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバーカホールダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, p4505 (1980)) や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 (Bitter, G. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, p5330 (1984)) 等が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0031】

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としてはGrace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, p788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたもの等が用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (Science, 122, p501 (1952))、DMEM培地 (Virology, 8, p396 (1959))、RPMI 1640培地 (The Journal of the American Medical Association, 199, p519 (1967))、199培地 (Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, p1 (1950)) 等が用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0032】

本発明においては、製剤化の際に本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子または前記遺伝子を有する発現ベクターを、リポソーム、マイクロカプセル、ミクロスフェア、サイトフェクチン、DNA—タンパク質複合体またはバイオポリマー等の人工ベクターに内包させた形態で用いてよい。中でも、リポソームまたはマイクロカプセルに内包することが好ましい。

【0033】

ここで、リポソームとは内部に水層を有する脂質二重膜でできた閉鎖小胞体であり、その脂質二分子膜構造が生体膜に極めて近似していることが知られている。リポソームを製造するに際し使用されるリン脂質としては、例えばレシチン、リゾレシチン等のホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール等の酸性リン脂質、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン等のスフィンゴリン脂質等が挙げられる。また、コレステロール等を添加することもできる。リポソームは、自体公知の方法に従って製造することができる。リポソームには、膜融合リポソーム、HVJ—膜融合リポソーム (Kaneda, Y et al., Biol. Chem., 264, p12126-12129 (1989)、Kato, K et al., Biol. Chem., 266, p3361-3364 (1991)、Tomita, N et al., Biochem. Biophys. Res., 186, p129-134 (1992)、Tomita, N et al., Cric. Res., 73, p898-905 (1993))、陽イオン性リポソーム (特表平2000-510151号公報、特表平2000-516630号公報) 等が知られている。センダウイルス (HVJ) と融合させたHVJ—膜融合リポソームを用いることが本発明において好ましい。リポソームの表面にHVJの糖タンパクを組み込み、

又は共有結合させてポリエチレングリコール等を添加すると、細胞への遺伝子導入効率が上昇する。マイクロカプセルはフィルムコートされた粒子であり、膜形成ポリマー誘導体、疎水性可塑剤、表面活性剤または／および潤滑剤窒素含有ポリマーの混合物からなるコーティング材料でコートされた粒子等で構成されるものが挙げられる。

【0034】

本発明の皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤および肉芽増生促進剤（以下、これらを総称して「本発明の薬剤」という）は、上述してきた本発明のヒト組換えHGFまたは本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を有効成分として含む。本発明の薬剤としては、（a）本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を有する発現ベクターを含有する皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤または肉芽増生促進剤、（b）本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を有する発現ベクターを含む形質転換体を含有する皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤または肉芽増生促進剤、（c）本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子または本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子を有する発現ベクターを含むリポソーム又はマイクロカプセル等を含有する皮膚潰瘍予防治療剤、血管新生促進剤または肉芽増生促進剤も含まれる。

【0035】

本発明の薬剤は、上記有効成分を通常は当該技術分野で用いられている製剤用添加剤とともに常法に従って製剤化することにより製造される。本発明の薬剤の剤形は特に限定されず、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、坐剤、注射剤、ペースト剤、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、ゲル状クリーム剤、ローション剤、乳剤、懸濁剤、湿布剤、硬膏剤、リニメント剤、エアゾール剤、シロップ剤、口腔剤、点眼剤または点鼻剤などが挙げられる。前記錠剤は、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被包錠もしくはフィルムコーティング錠などのコーティングを施した錠剤、または二重錠や多層錠であってよい。

【0036】

上記のような医薬製剤は、それ自体製剤学の分野で周知または慣用の方法に従って製造することが可能である。

錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤または顆粒剤などの固形製剤の製造には、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤または滑沢剤などを製剤用添加物として用いることができる。賦形剤としては、例えば乳糖、白糖もしくはブドウ糖等の糖類、デンプン等のデンプン類、結晶セルロース等が挙げられる。結合剤としては、例えばグルコースやマルチトールなどの糖類もしくは糖アルコール類、デンプンなどの多糖類、ゼラチンなどの天然高分子類、メチルセルロースもしくはカルボキシメチルセルロースなどのセルロース誘導体、ポリビニルピロリドンなどの合成高分子化合物等が挙げられる。崩壊剤としては、例えば澱粉、アルギン酸ソーダ、コーンスターク、ヒドロキシプロピルスターク、ポリビニルピロリドンまたはクロスカルメロースナトリウム等が挙げられる。滑沢剤としては、例えばステアリン酸塩、タルク、ホウ酸末またはポリエチレングリコール等が挙げられる。界面活性剤としては、例えば脂肪酸エステル等が挙げられる。

【0037】

本発明の薬剤が坐剤の剤形を有する場合は、親油性基剤、水溶性基剤または乳剤性基剤に、上記有効成分、および所望により、例えば局所麻酔薬、抗ヒスタミン剤、局所収れん剤、サルファ剤、抗生物質、瘡瘍治療薬、界面活性剤、ビタミン類、生薬エキス、胆汁酸類、防腐剤、賦形剤、吸収促進剤またはアミノ酸等の製剤用添加物を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。

【0038】

本発明の薬剤が注射剤の剤形を有する場合は、水溶性溶剤または非水溶性溶剤などの溶剤に、上記有効成分、および所望により溶解補助剤、緩衝剤または無痛化剤等の製剤用添加剤等の製剤用添加物を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。前記注射剤は、殺菌され、かつ血液と等張であることが好ましく、血液と等張にするために食塩、ブドウ糖またはグリセリンなどを含有していてもよい。さらに、所望により着色料、保存料、香料、風味剤、甘味剤等を医薬製剤中に含有していてもよい。

【0039】

本発明の薬剤が軟膏剤の剤形を有する場合、例えばワセリン、流動パラフィン、シリコンもしくは植物油などの油脂性基材；例えば親水ワセリンもしくは精製ラノリンなどの乳剤性基剤；例えばマクロゴールなどの水溶性基材などの基材に、上記有効成分、および所望により例えば陰イオン型もしくは非イオン型界面活性剤などの乳化剤またはパラオキシ安息香酸エステル類などの保存剤等の製剤用添加剤を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。

【0040】

本発明の薬剤がゲル剤の剤形を有する場合、水にゲル化剤（例えばカルボキシビニル重合体、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはアルギン酸プロピレンゲリコールエステル等）などを加えて得られる基材に、上記有効成分、および所望により、例えば低級アルコール、中和剤、界面活性剤または吸収促進剤などの製剤用添加剤を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。

【0041】

本発明の薬剤がクリーム剤の剤形を有する場合、例えば高級脂肪酸エステル類（例えばミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、セバシン酸ジエチル、ラウリン酸ヘキシル、イソオクタン酸セチル等）、低級アルコール（例えばエタノール、イソプロパノール等）、炭水化物（例えば流動パラフィン、スクワラン等）、多価アルコール（例えばプロピレンゲリコール、1,3-ブチレンゲリコール等）または高級アルコール（例えば2-ヘキシルデカノール、セタノール、2-オクチルドデカノール等）等を含む基材に、上記有効成分、および所望により、例えば乳化剤、防腐剤、吸収促進剤またはかぶれ防止剤などの製剤用添加剤を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。

また、クリーム剤とゲル剤の中間の性質を有するゲル状クリーム剤とするためには、上記のクリーム剤にゲル化剤および中和剤を加えればよい。

【0042】

本発明の薬剤が外用液剤の剤形を有する場合、溶剤に、上記有効成分、および所望により、例えば緩衝剤、安定化剤、防腐剤、pH調製剤、溶剤、溶解補助剤、着香剤、ゲル化剤、矯味剤または清涼化剤等などの製剤用添加剤を含有させることにより本発明の薬剤を製造することができる。前記溶剤としては、例えばグリセリン、プロピレンゲリコール、エタノール、イソプロパノール、ブチレンゲリコール、水、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、ブドウ糖、イブシロンアミノカプロン酸、グリシン、グルタミン酸塩、ヒアルロン酸ナトリウム、ポリエチレンゲリコール類、カルボキシビニルポリマー類やセタノール、ステアリルアルコールなどの高級アルコール類、中鎖脂肪酸エステル類やミリスチン酸イソプロピルなどの脂肪酸エステル類、ステアリン酸などの高級脂肪酸、スクワラン、流動パラフィン、白色ワセリンまたは精製ラノリンなどを挙げることができる。

ここで、外用液剤としては、洗浄、注入、湿布、吸入、噴霧、浣腸、塗布、薬浴、清拭、消毒、点眼、洗眼、点耳または点鼻など外用に供する液体製剤が挙げられる。

【0043】

本発明の外用液剤を通常噴射剤と共に用いることによりエアゾール剤を製造することができる。噴射剤としては通常エアゾールに用いられるジメチルエーテル、液化石油ガス、N₂ガス、亜酸化窒素ガス、CO₂ガス、代替フロンガス等を挙げることができる。噴射剤を用いないで圧縮空気を用いることもできる。また、これらの混合物を用いてもよい。

【0044】

本発明の薬剤については、経口投与、非経口投与または局所投与など種々の投与方法の中から、その剤形に応じて投与方法を適宜選択すればよい。本発明の薬剤は皮下または筋肉内等に埋め込むこともできる。

本発明のヒト組換えHGFをコードする遺伝子は、上述のように製剤化せずに、そのままでまたは摂取促進のための補助剤とともに直接生体に投与することもできる。かかる投与方法は公知の方法に従って行ってよいが、例えばDNAを直接体内に導入するi n v

i v o 法、又は投与されるヒト等からある種の細胞を体外に取り出して当該細胞にヒト組換え H G F をコードする遺伝子を導入し、その形質転換細胞を体内に戻す e x v i v o 法がある（日経サイエンス、4月号、20-45（1994）、月間薬事、36、23-48（1994）、実験医学増刊、12、15（1994））。それぞれの方法において、本発明のヒト組換え H G F をコードする遺伝子を細胞に導入する方法としては、上述したようにアデノ随伴ウイルス、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター等の発現ベクターに遺伝子を含有させて該発現ベクター等を細胞に導入する遺伝子導入方法、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、D E A E デキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子銃で担体（金属粒子等）とともに D N A を細胞内に導入する方法等（Wu et al., J. Biol. Chem. 267, 963-967(1992)、Wu et al., J. Biol. Chem. 263, 14621-14624, (1988)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 2726-2730 (1991)）が挙げられる。またリポソーム等を用いる場合には、リポソーム法、H V J-リポソーム法、陽イオン性リポソーム法、リポフェクチン法、リポフェクトアミン法等が挙げられる。中でも、導入効率の観点から、アデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを用いる遺伝子導入方法が望ましい。

【0045】

本発明の薬剤の投与量および投与頻度は特に限定されず、治療すべき病態の種類、患者の年齢および体重、症状および疾患の重篤度などの種々の条件に応じて適宜選択することが可能である。例えば静脈投与の場合、その投与量はヒト組換え H G F として約 250～1000 μ g/Kg/日、好ましくは約 300～800 μ g/Kg/日、特に好ましくは、約 300～550 μ g/Kg/日であり、ヒト組換え H G F をコードする遺伝子として約 0.2～40,000 μ g/Kg/日、好ましくは約 2～2,000 μ g/Kg/日である。外用薬などによる局所投与の場合、有効成分の投与量は約 0.001～30 mg 程度、好ましくは約 0.01～3 mg 程度である。

【0046】

本発明の薬剤は、血管新生促進剤または肉芽増生促進剤として使用することができる。さらに、血管新生促進作用または肉芽増生促進作用を利用して皮膚潰瘍予防治療をはじめ、消化性潰瘍治療、抗ガン、手術後の皮膚縫合、角膜手術などにおける医薬品的用途はもちろん、育毛剤または化粧品として用いることもできる。

【実施例】

【0047】

以下に、実施例等を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではないことは言うまでもない。

(1) 本発明のヒト組換え H G F の作製

〔Seki, T., Ihara, I., Sugimura, A., Shimonishi, M., Nishizawa, T., Asami, O., Hagiya, M., Nakamura, T. and Shimizu, S., "Isolation and expression of cDNA for different forms of hepatocyte growth factor from human leukocyte.", Biochemical Biophysical Research Communications, 172, 321-327 (1990)〕に記載の方法に従つて、第一クリングルドメインにおいて 5 個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換え H G F を発現ベクターを導入した C H O 細胞の培養上清から精製した。ヒト組換え H G F の精製度は S D S ゲル電気泳動後のタンパク質染色から 98 % 以上であった。なお、前記第一クリングルドメインにおいて 5 個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換え H G F のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。

【0048】

(2) 皮膚潰瘍モデルの作成とヒト組換え H G F の局所投与

糖尿病を自然発症する変異マウス (C 5 7 B L / K s J - d b / d b, 10 週齢の雌) を実験に使用した。各マウスの背部に 2 カ所、パンチバイオブシー（皮膚生検採取用器具）を用いて直径 6 mm の皮膚全層欠損潰瘍モデルを作成した。その後透明の半透過性被覆剤 (BIOCLUSIVE, Johnson & Johnson MEDICAL) にて潰瘍部を覆った。全層欠損処置を行った日を 0 日目として、27 ゲージの注射針を使用して被覆剤の上から潰瘍部に (1) に

において調整したヒト組換えHGFの溶液または比較例としての生理食塩水(25μl)を潰瘍モデル作成直後から連日投与した。ヒト組換えHGFの投与量は10μg/潰瘍/日である。マウスを潰瘍モデル作成後、7日目、14日目、21日目ならびに28日目に潰瘍部の解析を行った。

【0049】

(3) 組織学的解析ならびに血管新生の解析

血管の組織染色を行う場合、70%エタノールにて固定パラフィン包埋した切片を0.1%トリプシンにて室温で10分間処理し、PBS(リン酸緩衝生理食塩水)による洗浄後、3%過酸化水素を含むPBSにて30分間処理した。次に切片を抗CD31/PECAM-1抗体(PharMingen社の抗体を50倍に希釈したもの)にて室温にて2時間インキュベートした後、ビオチン標識西洋ワサビペーパーオキシダーゼ結合抗ラットIgG抗体(DAKO社の抗体を200倍に希釈したもの)にて30分間インキュベートした。シアミノベンチジンと過酸化水素を含む基質溶液中で酵素抗体反応を検出し、検出後へマトキシリンにて細胞核を染色した。切片の顕微鏡観察(100倍の視野)によって血管密度を定量した。

【0050】

(4) 肉芽組織の解析

肉芽組織を測定する場合、ヘマトキシリンならびにエオジン染色した組織切片を使用した。潰瘍部表面に対して垂直になるように調製した組織切片の画像をコンピューターに取り込み、肉芽組織をトレースした後、NIH画像解析ソフトウェアにて肉芽組織の面積を定量した。

【0051】

(5) 潰瘍部の閉鎖(治癒)率の決定

潰瘍部の閉鎖(治癒)を測定するため、潰瘍部片縁をスライドガラス上にトレースした後、CCDカメラにてコンピューターに取り込み、NIH画像解析用ソフトウェアを用いる画像解析によって潰瘍部の面積を定量した。潰瘍部の閉鎖率が0%は潰瘍部の閉鎖が認められない状態に相当し、100%は潰瘍部の閉鎖が完了したことに相当している。

【0052】

上記実験の結果を以下に示す。

(結果-1) ヒト組換えHGFによる血管新生の促進

血管新生は皮膚潰瘍の治癒を含め組織修復において重要な役割を担っていることから、血管新生に対するヒト組換えHGFの効果を解析した。皮膚潰瘍モデル作成7日後の組織切片を用いて免疫染色によって血管を検出した(図1Aに血管を染色した組織像を示す)。その結果、対照(生理食塩水投与群)での血管密度は33.4±6.0/mm²であったのに対して、10μg/潰瘍/日のヒト組換えHGF投与によって血管密度は59.6±4.5/mm²に促進された(図1B)。したがって、ヒト組換えHGFは血管新生を促進することが明らかとなった。

【0053】

(結果-2) ヒト組換えHGFによる肉芽組織の増生促進

肉芽組織の増生に対するヒト組換えHGFの効果を調べた(図2A)。肉芽組織の増生は皮膚潰瘍モデル作成後7日目の組織切片を用いた画像解析によって測定した。その結果、皮膚潰瘍モデル作成後の組織を調べると、ヒト組換えHGFの投与によって肉芽組織の増生が認められた(図2A)。画像解析の結果、対照(生理食塩水投与群)においては肉芽組織の面積が1.30±0.15mm²であったのに対して、ヒト組換えHGFは容積依存的に肉芽組織の面積を促進し、10μg/潰瘍/日のヒト組換えHGF投与によって肉芽組織の面積は対照の2.3倍に増大し、ヒト組換えHGFは肉芽組織の増生を促進することが認められた(図2B)。

【0054】

(結果-3) ヒト組換えHGFによる潰瘍部の閉鎖(治癒)の促進

皮膚潰瘍部にヒト組換えHGF(10μg/潰瘍/日)を連日5日間投与した。その結

果、ヒト組換えHGFによる容量依存的な潰瘍部の閉鎖（治癒）促進が2日後から認められた。潰瘍モデル作成10日後、生理食塩水を投与した対照の皮膚においては、潰瘍閉鎖率（治癒率）が41.1±6.8%であった。これに対して、10μg/HGF/日のヒト組換えHGF投与によって潰瘍閉鎖率（治癒率）が85.0±4.0%に促進された。また、対照（生理食塩水投与群）では潰瘍部の閉鎖（治癒）完了に21日要したのに対して、10μg/HGF/日のヒト組換えHGF投与によって14日において潰瘍部の閉鎖（治癒）完了が認められた（図3）。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】図1Aは実施例（3）において血管を染色した組織像を示す。図1Bはヒト組換えHGF投与群と生理食塩水投与群の血管密度を示す。図中、「生理食塩水」は生理食塩水投与群を示し、「HGF（10μg）」とはヒト組換えHGF投与群を示す。以下の図面も同様である。

【図2】図2Aは、ヒト組換えHGF投与群と生理食塩水投与群における肉芽組織の増生の程度を示す。図2Bはヒト組換えHGF投与群と生理食塩水投与群の肉芽面積を示す。

【図3】ヒト組換えHGF投与群と生理食塩水投与群の潰瘍閉鎖率（治癒率）を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kringle pharma CO.,LTD.

<110> NAKAMURA Toshikazu

<120> A pharmaceutical composition for treating or preventing cutaneous ulcer, which comprises recombinant human HGF.

<130> K12J1127

<160> 3

<210> 1

<211> 723

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu

1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln

20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr

35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val

50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu

65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys

| 85 | 90 | 95 |
|---|-----|-----|
| Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met | | |
| 275 | 280 | 285 |
| Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln | | |
| 290 | 295 | 300 |
| Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro | | |
| 305 | 310 | 315 |
| 320 | | |

Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro
 325 330 335
 Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 340 345 350
 Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg
 355 360 365
 Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln
 370 375 380
 Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln
 385 390 395 400
 Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp
 405 410 415
 Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu
 420 425 430
 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr
 435 440 445
 Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys
 450 455 460
 Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile
 465 470 475 480
 Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr
 485 490 495
 Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His
 500 505 510
 Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg
 515 520 525
 Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly
 530 535 540
 Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 545 | 550 | 555 | 560 |
| Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu | | | |
| 565 | 570 | 575 | |
| Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile | | | |
| 580 | 585 | 590 | |
| Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser | | | |
| 595 | 600 | 605 | |
| Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu | | | |
| 610 | 615 | 620 | |
| Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His | | | |
| 625 | 630 | 635 | 640 |
| His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala | | | |
| 645 | 650 | 655 | |
| Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu | | | |
| 660 | 665 | 670 | |
| Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro | | | |
| 675 | 685 | 685 | |
| Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val | | | |
| 690 | 695 | 700 | |
| Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val | | | |
| 705 | 710 | 715 | 720 |
| Pro Gln Ser | | | |

<210> 2

<211> 2172

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtgggtga ccaaactcct gccagccctg ctgcgtgcagc aigtccctcct gcatctcctc 60

atccctgaaa agaccagttt cagtttat ggctggggct acaciggatt gatcaactat 1860
gtatggccat tacgagttggc acatctctat ataatggaa atgagaaaatg cagccagcat 1920
catcgaggga aggtgactct gaatgagtct gaaataatgtg ctggggctga aaagatttgg 1980
tcaggaccat gtgagggggta ttatggttggc ccacttgttt gtgagcaaca taaaatgaga 2040
atggttttttt ggttcatatgt tccctggtcgt ggatgtgcctt ttcctaaatcg tccctggttttt 2100
tttgcggtagcatatata tgcaaaaatgg atacacaaaaa ttattttaac atataaggta 2160
ccacagttcat ag 2172

〈210〉 3

<211> 728

〈212〉 PRT

〈213〉 *Homo sapiens*

<400> 3

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu

1 5 10 15

Leu His Leu Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln

20 25 30

Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr

35 40 45

Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val

50 55 60

Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu

65 70 75 80

Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys

85 90 95

Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe

100 105 110

Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys

115 120 125

Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys
 130 135 140
 Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 145 150 155 160
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
 165 170 175
 Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser
 180 185 190
 Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu
 195 200 205
 Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp
 210 215 220
 His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 225 230 235 240
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp
 245 250 255
 Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr
 260 265 270
 Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys
 275 280 285
 Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu
 290 295 300
 Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 305 310 315 320
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu
 325 330 335
 His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn
 340 345 350
 Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr

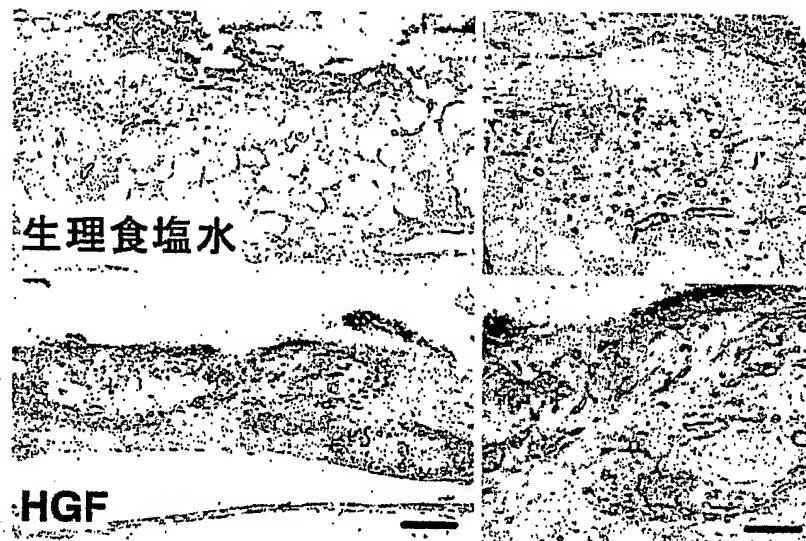
| | | |
|---|-----|-----|
| 355 | 360 | 365 |
| Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp | | |
| 370 | 375 | 380 |
| Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp | | |
| 405 | 410 | 415 |
| Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala | | |
| 420 | 425 | 430 |
| Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His | | |
| 435 | 440 | 445 |
| Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys | | |
| 450 | 455 | 460 |
| Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu | | |
| 465 | 470 | 475 |
| Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val | | |
| 485 | 490 | 495 |
| Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg | | |
| 500 | 505 | 510 |
| Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp | | |
| 515 | 520 | 525 |
| Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr | | |
| 530 | 535 | 540 |
| Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys | | |
| 545 | 550 | 555 |
| Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly | | |
| 565 | 570 | 575 |
| Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp | | |
| 580 | 585 | 590 |

Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu
595 600 605
Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn
610 615 620
Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
625 630 635 640
Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu
645 650 655
Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp
660 665 670
Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu
675 685 685
Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly
690 695 700
Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
705 710 715 720
Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser
725

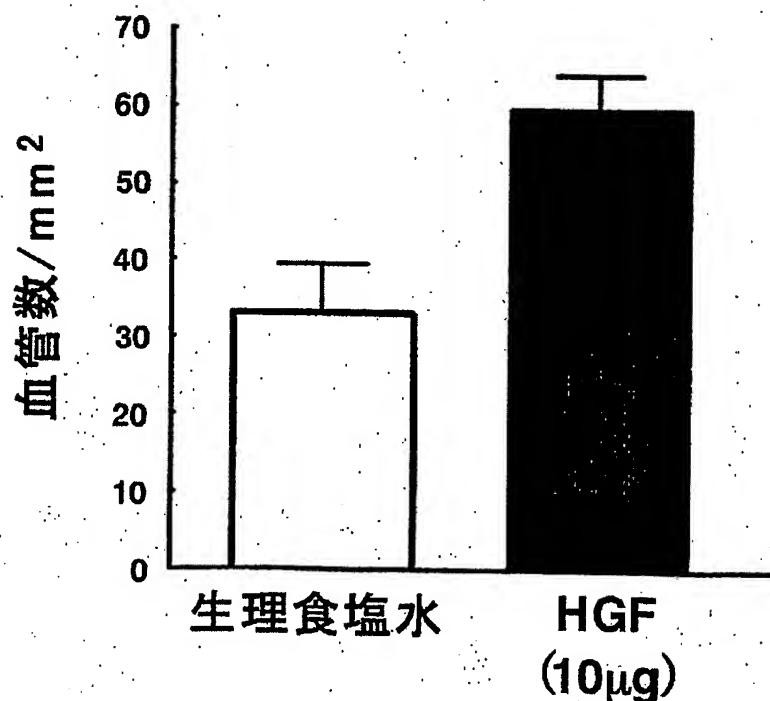
【書類名】 図面

【図1】

A.



B.



【図2】

A.

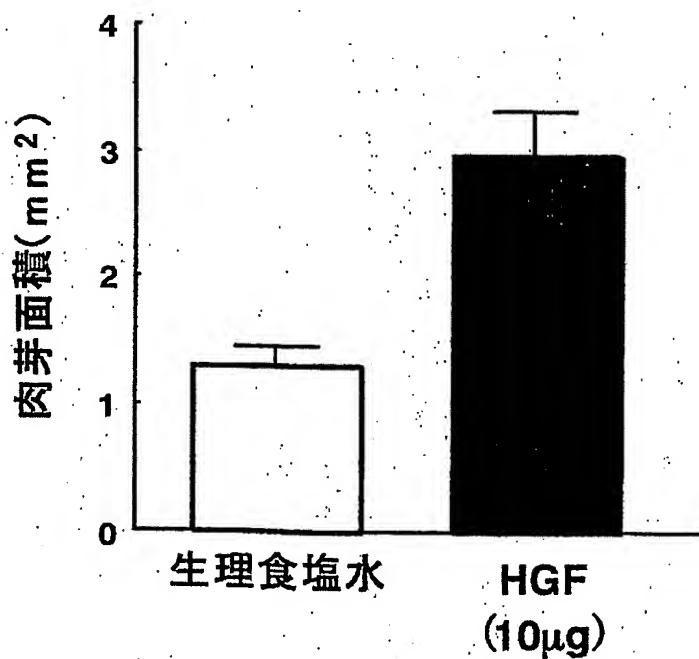


生理食塩水

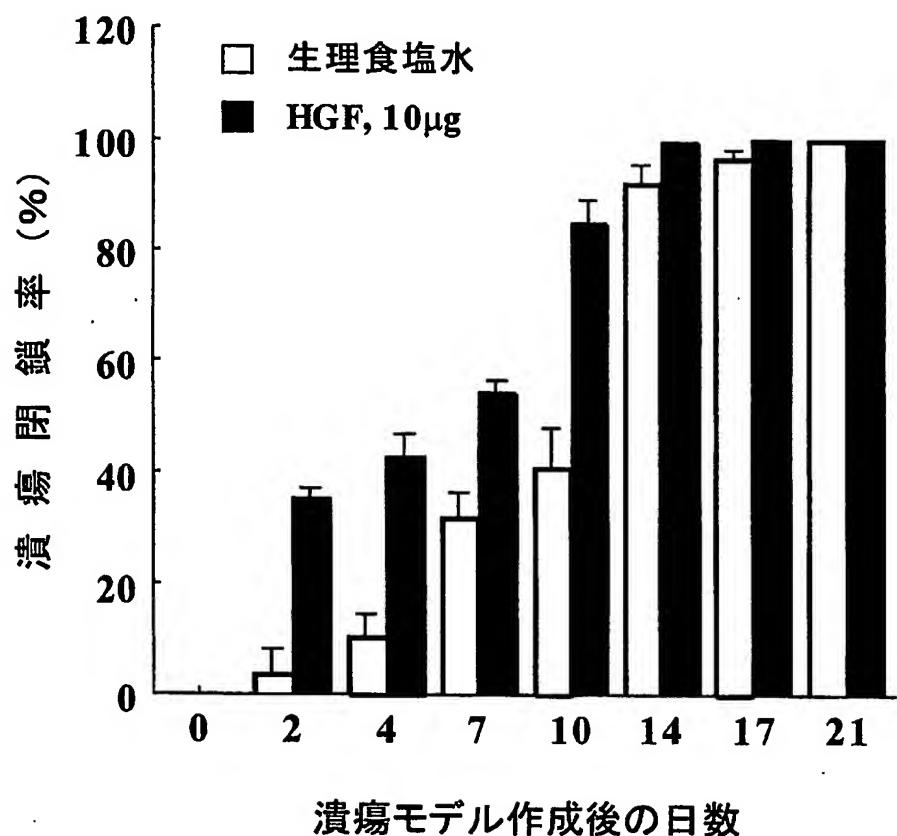


HGF

B.



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 本発明は、肉芽増生および血管新生を促進し組織修復に有効な医薬品、なかでも皮膚潰瘍予防治療剤として有用な医薬品を提供することを目的とする。

【解決手段】 第一クリングルドメインにおいて5個のアミノ酸残基が欠損しているヒト組換えHGFを含有する血管新生促進剤、肉芽増生促進剤および皮膚潰瘍予防治療剤。

【選択図】 なし

特願 2003-311936

出願人履歴情報

識別番号 [591115073]

1. 変更年月日 1997年11月18日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府高槻市高見台4-1

氏 名 中村 敏一

2. 変更年月日 2003年12月 9日

[変更理由] 住所変更

住 所 京都府京都市左京区岡崎法勝寺町1番地の4

氏 名 中村 敏一

特願 2003-311936

出願人履歴情報

識別番号 [502068908]

1. 変更年月日 2002年10月24日
[変更理由] 住所変更
住 所 大阪府大阪市中央区淡路町2-1-13 弥栄ビル403
氏 名 クリングルファーマ株式会社

2. 変更年月日 2003年 9月 8日
[変更理由] 住所変更
住 所 大阪府大阪市中央区南船場2-10-27 KAZU ITビ
ル 605号室
氏 名 クリングルファーマ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.